St-Onge Noa, Longpré Félix, Courville Mattéo

Biologie Cellulaire, 101-SN1-RE, gr. 02

ÉPREUVE CERTIFICATIVE – VOLET 1

Réparation génétique de la drépanocytose : application de CRISPR-Cas9 aux cellules souches humaines

Travail remis à

M. Sylvain Foisy

Département des Sciences de la nature

Cégep du Vieux-Montréal

10 décembre 2024

RÉSUMÉ

Depuis quelques années, la technologie CRISPR-Cas9, découverte par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, a permis de nombreuses avancées scientifiques, principalement dans le domaine de la santé. Basée sur le fonctionnement du système immunitaire de certaines cellules procaryotes, le système CRISPR-Cas9 agit comme un ciseau moléculaire qui permet la modification du génome eucaryote. Bien qu'elle entraine de nombreux questionnements éthiques, cette découverte permettrait de mettre en place des traitements visant à guérir certaines maladies génétiques. C'est le cas de l'anémie falciforme, une maladie génétique qui s'attaque aux globules rouges, modifiant leur forme en croissant ou faucille et les rendant plus fragiles. Les patients atteint de cette maladie peuvent souffrir de crises de douleurs aigues qui peuvent survenir partout dans le corps, de la très grande fatigue, des maux de têtes, etc.

Dans cette étude, nous rapportons une méthode pour mobiliser, éditer et réintroduire des cellules CD34+ chez les patients atteints de drépanocytose, et évaluons plusieurs facteurs de réussite liés à notre protocole.

INTRODUCTION

Lors de la formation du génome, il arrive que certains gènes rencontrent des mutations. Elles surviennent lorsqu'il y a substitution, insertion ou délétion d'un nucléotide. Bien qu'elles n'aient pas toujours un impact majeur, comme les mutations silencieuses ou certaines mutations faux-sens, d'autres peuvent grandement affecter le métabolisme. En effet, la mutation non-sens substitue un nucléotide de sorte que le codon original devienne un codon stop; cela a pour effet de stopper prématurément la formation de la protéine, donc de changer sa forme. L'insertion ou la délétion de codon a plutôt pour conséquence de décaler la lecture des codons par le ribosome de sorte que la forme initiale de la protéine soit complètement changée. Qui dit forme d'une protéine dit aussi fonction, les mutations du génome pouvant donc mener à des maladies dites génétique. Il existe deux types majeurs de mutations[1] : récessives ou dominantes. Une maladie génétique récessive survient quand un individu possède deux allèles récessifs de la mutation, en d'autres mots que la mutation liée à la maladie est présente dans l'allèle « faible » et que celui-ci possède deux de ces allèles. Pour qu'un patient soit atteint, il faut que ses deux parents possèdent au moins

[1] Pour leur transmission lors de la reproduction sexuée

un gène récessif. Une personne hétérozygote, qui possède deux allèles différents (souvent un dominant et un récessif), ne pourrait donc pas savoir qu'il est porteur, car son gène dominant prend le dessus. Dans le cas où l'allèle muté est dominant, on dit que c'est une maladie génétique dominante. Bien que ce type de maladie soit moins fréquent, le risque de transmission est beaucoup plus élevé, car un seul allèle muté est nécessaire pour l'avoir.

La drépanocytose (HbSS : aussi appelée anémie falciforme, anémie à corps falciforme ou sicklémie) est une maladie sanguine génétique autosomique (non-relative aux chromosomes sexuels (1)) récessive (les deux copies du gènes doivent être mutées pour que le patient soit affecté – dans la plupart des cas, cela veut dire que les deux parents rs334(A;T) [Voir **TABLE 1**] ont transmis le gène muté (2)) causée par la substitution d'une seule base nucléique d'Adénine par une Thymine. Cette substitution (Mutation homozygote rs334(T) (3)) prend place dans le 6ième codon (Hémoglobine S (4)) du premier exon du gène codant de la β-globine (une partie importante de l'Hémoglobine Adulte, qui est composée de 2 β-globine et 2 α-globine), permutant le codon de l'acide glutamate (GAG) hydrophile avec un codon de valine (GTG) hydrophobe (5). Les globules rouges d'un patient affecté d'anémie falciforme sont plus fragiles et meurent plus vite (6), le taux d'hémoglobine dans le sang étant en moyenne inférieur de 17% à 29% (7) par rapport à celui d'une personne en bonne santé (anémie). Les globules rouges du patient auront également une forme de croissant/faucille (d'où le terme « falciforme », en forme de faucille) qui rendra difficile et/ou impossible leur passage dans les petits vaisseaux sanguins. L'anémie falciforme est une maladie multi-systémique qui se manifeste autant en crises aigues (crises de douleur dues aux globules rouges déformés, crises vaso-occlusives ischémiques) qu'en symptômes chroniques (dus à l'anémie) (6). La polymérisation (c'est-à-dire la « fusion » de l'HbS avec les tissus environnants (8)) de l'hémoglobine falciforme désoxygénée est ce qui cause ces symptômes (9), amenant à un raccourcissement important de la durée de vie des patients affectés.

Bien que les gènes responsables de la drépanocytose puissent être présent chez presque tous les groupes de descendance génétique, ils semblent beaucoup plus prédominants dans certaines populations (10). L'allèle responsable de la drépanocytose est en plus grande proportion présentes chez les Africains subsahariens, mais touche aussi, considérablement, des peuples du sous-continent indien, de la péninsule arabique, ainsi que les populations du Maghreb [Voir **FIGURE 1**]. L'allèle responsable de la sicklémie semble avoir passé le test de l'évolution, car elle vient avec

une augmentation de dix fois les chances de survie d'un cas de malaria grave chez les porteurs des gènes hétérozygotes (3). On observe, alors, une corrélation entre les zones géographiques où les dangers de la malaria sont élevés et la présence des gène causant la drépanocytose, soit étant les régions mentionnées ci-haut. (11) Chez les Africains subsahariens l'allèle responsable du HbS est porté par une personne sur douze (12). L'allèle, étant récessif, n'affecte pas les hétérozygotes, mais peut se manifeste quand même à travers certains traits particuliers, comme une faiblesse à l'effort physique de très haute intensité et, comme mentionné précédemment, une résistance à la malaria (11) et un risque plus élevé de mort soudaine (13). Chez les homozygotes, on parle alors pleinement de la drépanocytose.

Le traitement curatif le plus répandu pour la drépanocytose est habituellement la greffe allogénique (greffe de cellules souches venant d'un donneur) de cellules souches hématopoïétiques (cellules immatures capables de s'auto-renouveler et de se différentier en toutes les cellules hématopoïétiques matures du corps; cellules souches du sang (14)) d'un donneur HLA géno-identique (critère de compatibilité d'une greffe de cellules souches) (5). Cette option est limitée par le manque de donneurs compatibles (moins de 20% des patients éligibles à une greffe allogénique ont un donneur HLA-compatible (15)) pour la majorité des patients : les thérapies actuelles (greffe allogénique, transfusions, médications comme l'hydroxyurée, anti-douleurs) s'axent alors principalement sur la gestion de symptômes.

Des recherches récentes ont mis en lumière le rôle du facteur transcriptionnel BCL11A dans la répression de la γ-globine, une composante de l'HbF (Hémoglobine foétale – 2 γ-globine et 2 α-globine), et son lien avec la manifestation de symptômes cliniques de l'anémie falciforme – les nouveau-nés et jeunes enfants sont généralement asymptomatiques tant que leur taux d'HbF reste élevé et deviennent symptomatiques durant la première année de leur vie, quand la synthèse de l'HbF diminue (16). Les patients atteints d'anémie falciforme et de persistance héréditaire d'HbF (où l'expression de l'HbF (17) est maintenue même pendant la vie adulte) ne présentent pas ou peu de symptômes cliniques (9). Ce phénomène existe parce que l'HbF prolonge le temps nécessaire à la polymérisation de l'HbS, permettant aux globules rouges de s'échapper de la microcirculation vers les plus grosses veines jusqu'aux poumons, là où les polymères d'HbS se défont après leur oxygénation (18). En bref, des niveaux élevés d'HbF sont associés directement avec une réduction du taux de mortalité dans les patients atteints de drépanocytose.

Un protocole récent, apparaissant dans le New England Journal of Medicine (9), utilise une approche basée sur CTX001 (19), une infusion intraveineuse qui utilise la technologie CRISPR-Cas9 pour augmenter la production de HbF en modifiant le gène qui encode le facteur transcriptionnel BCL11A (20), afin de réduire la quantité qui est produite. Le traitement commence par la collecte de cellules souches hématopoïétiques du patient puis leur modification en laboratoire. Les cellules souches sont ensuite retournées au patient via une greffe – dans le cadre de l'administration intraveineuse de CTX001 – de cellules souches (qui est largement moins dommageable et risqué qu'une greffe allogénique). Ensuite, les cellules souches transplantées se greffent à la moelle osseuse, survivent et se multiplient, pour finalement maturer en globules rouges capables de produire de l'hémoglobine fœtale.

MÉTHODES

1. Mobilisation et aphérèse des celulles souches hématopoïétiques CD34+ du patient
2. Conception et production du complexe CTX001 (Thérapie CRISPR-Cas9)
    a. Synthèse de l'ARN guide
    b. Production de la protéine Cas9
    c. Assemblage du complexe ribonucléoprotéïque
3. Conditionnement myéloablatif au Busulfan
4. Administration de médicaments prophylaxiques
5. Infusion de CTX001

MATÉRIEL

CRISPR - SYNTHÈSE DE L'ARN GUIDE (21)

- Équipement requis
    - Colonnes de synthèse sur phase solides ⇒ préparer assez pour synthèse et amorçage du système de synthèse
    - Instrument de synthèse automatisée (ex : Kilobaser)
- Réactifs
    - Diluant : acétonitrile anhydre
    - Activateur : 0,5 M 5-ethylthio-1H-tétrazole (ETT) dans le diluant
    - Oxydant : 0,02 M d'iode dans 0,4% (v/v) pyridine/tétrahydrofurane (THF)
    - Mélange de déprotection : 3% (v/v) acide trichloroacétique dans dichlorométhane

- Mélanges de capping/déblocage
  - Cap A : 10% (v/v) anhydre acétique dans THF
  - Cap B : 10% (v/v) méthylimidazole dans THF
- Mélange d'oxydation : 0,02 M d'iodine 7:2:1 (v/v/v) THF/pyridine/eau
- Laveur anhydre = diluant
- Solutions de phosphoramidites d'ARN protégés
  - Bases protégées à 0,1 M dans l'acétonitrile
    - tert-butyldiméthylsilyle à l'hydroxyl 2'
    - diméthoxytrityl en 5'
    - phosphite triester en 3'

- Solution de déprotection et de clivage : ammoniac (concentré (28-33% v/v dans H2O)

CRISPR – PURIFICATION (22)

- Équipement requis
  - Système HPLC compatible avec colonnes en phase inverse
  - Colonnes HPLC C18 ou C8 adaptées à la purification de nucléotides (250 x 4,60 mm pour une échelle de synthèse d'1 µmol)
  - Équipement de séchage sous vide ou évaporateur rotatif
- Réactifs
  - Tampon A (0,1 M triéthylammonium acétate, pH 6,5)
    - Mélanger 14 mL de triéthylamine avec 900 mL d'eau. Ajuster le pH à 6,5 avec de l'acide acétique, puis compléter à 1L.
  - Tampon B (0,1 M triéthylammonium actétate dans 65% acétonitrile)
    - Mélanger 14 mL de triéthylamine avec 300 mL d'eau et 650 mL d'acétonitrile. Ajuster le pH à 6,5 avec de l'acide acétique et compléter à 1L.
- Consommables
  - Filtres pour seringues de 0,22µm
  - Fioles adaptées à la collecte des fractions d'élution

CRISPR – DESSALAGE (21)

- Équipement : le même qui est requis pour la purification
- Réactifs
  - Tampon C (0,1 M tryéthylammonium bicarbonate, pH 7,8)
    - Ajouter 100 mL de solution 1M triéthylammonium bicarbonate (préparée à partir de tryéthylamine et de CO2) à 900 mL d'eau
  - Tampon D (0,1 M triéthylammonium bicarbonate dans 65% acétonitrile/35% eau (v/v)
    - Mélanger 100 mL de solution 1M triéthylammonium bicarbonate avec 250mL d'eau et 650 mL d'acétonitrile

CAS9 (23)

- Réactifs et tampons
  - Tampon de lyse : 20mM Tris-HCl, 100 mM NaCl
  - Tampon de lavage I : 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl
  - Tampon de lavage II : 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl
  - Tampon de stockage 20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 5% glycérine, 1 mM $MgCl_2$
  - Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), 0,5 mM pour induction
  - RNase inhibitor (optionnel pour éviter toute dégradation de l'ARNg).
- Matériel biologique
  - Plasmide d'expression pCold I contenant le gène Cas9 étiquetté CL7 et le site de clivage HRV 3C (produit en protocole.1)
  - Souche d'E. coli Rosetta (DE3) pour la production de protéine Cas9
  - ARN guide produit précédemment
- Équipement
  - Centrifugeuse réfrigérée
  - Agitateur/incubateur pour culture bactérienne (capable d'être mis à 37°C et 16°C)
  - Colonne de purification Im7, pré-remplie avec des billes d'agarose couplées à la protéine Im7
  - Protéase HRV 3C marquée CL7 pour le clivage en colonne

  - Tubes Falcon 50mL et 16mL pour la culture et la préparation d'échantillons
  - Microcentrifugeuse et tubes de 1,5mL (compatibles avec)
  - Pipettes, micropipettes et pointes stériles (filtrées, éviter toute contamination avec RNases)
- Milieu de culture bactérienne
  - Milieu LB préparé
  - Antibiotique adapté (selon le plasmide utilisé, le protocole fera référence à l'ampicilline)
  - Flacons/erlenmeyers **stériles**
- Équipement de lyse et de purification
  - Sonicateur **ou** presse française pour la lyse cellulaire
  - Colonne de purification compatible avec le tag CL7 et la protéine Im7
  - Agitateur thermique pour l'incubation à 16°C avec la protéase HRV 3C
- Matériel pour les validations et applications
  - Gel d'agarose et colorants adaptés pour l'électrophorèse
  - ADN cible (plasmides et/ou séquences d'intérêt) pour tester l'activité in vitro

ASSEMBLAGE FINAL (9)

- Réactifs
  - Complexe ribonucléoprotéique CRISPR-Cas9
  - Cellules CD34+ isolées du patient
  - Tampon d'électroporation spécifique MaxCyte
  - Milieu de culture adapté aux cellules CD34+
- Équipement
  - Système MaxCyte Gen2 GT.
  - Cassettes d'électroporation compatibles (OC-100)
  - Centrifugeuse
  - Pipettes stériles

PROTOCOLE

CRISPR – SYNTHÈSE DE L'ARN GUIDE

1. Préparation de l'instrument de synthèse automatisée
   I. Installer les réactifs nécessaires (activateur, oxydant, mélanges de capping, diluant) dans l'instrument de synthèse automatisée
      - L'instrument de synthèse automatisée gère par lui-même les quantités de solvants/réactifs. Voir les instructions et le manuel de l'instrument pour les quantités adéquates

   II. Installer les phosphoramidites protégés et le solvant anhydre
2. Programme de synthèse
   I. Sélectionner le cycle de synthèse phosphoramidite
   II. Entrer la séquence de l'ARN guide à produire. Spécifier la conversation du groupe protecteur 5' final de l'oligonucléotide, qui sera retiré lors de la purification.
   III. Charger une colonne de synthèse contenant un nucléotide
   IV. Lancer le cycle de synthèse automatisée (Figure ____)
      i. Déprotection
         - En milieu de dichlorométhane
         - Acide trichloroacétique 3% pour le clivage du groupement protecteur 5'
         - Rinçage à l'acétonitrile

      ii. Couplage
         - En milieu anhydre, dans l'acétonitrile
         - Introduction du phosphoramidite dans le milieu avec ETT. L'extrémité 3' du nucléotide *n* réagit avec l'hydroxyle 5' du nucléotide *n-1*

      iii. Capping
         - Ne change pas de milieu
         - Protection des groupes non-couplés (nucléotides qui ne se sont pas attachés)

- Introduction de la solution Cap A et Cap B

iv. Oxydation

- Ajout de la solution d'oxydation
- Stabilisation de la liaison phosphodiester (phosphite triester → phosphotriester)

V. Répéter toutes les étapes III-IV(i-iv) pour chaque nucléotide

3. Clivage et déprotection

I. Clivage et déprotection automatique de l'ARNg synthétisé en utilisant la solution d'ammoniac concentré

II. Clivage manuel (Voir Figure _____et Protocole (21))

CRISPR – PURIFICATION

1. Préparation de l'HPLC

I. Installer la colonne HPLC choisir sur le système HPLC

II. Préparer et filtrer les tampons A et B pour éliminer les particules susceptibles de boucher la colonne

III. Régler le débit de la pompe à 1mL/min pour une colonne 250 x 4,60 mm

IV. Ajouter les tampons A et B selon les instructions de l'instrument HPLC

2. Injection et séparation

I. Diluer l'oligonucléotide synthétisé et déprotéger dans de l'eau stérile

II. Filtrer l'échantillon à travers un filtre (0,22µm) avant l'injection

III. Injecter 50-100µL de l'échantillon (selon les capacités de la colonne)

IV. Exécuter plusieurs gradients de séparation (en petits échantillons pour éviter de surcharger les instruments)

i. 0-100% tampon B (25 minutes)

ii. Détecter les pics à une longueur d'onde de 260mm (détection des bases nucléotidiques). Puisque le groupement protecteur 5' final a été conservé, le dernier pic devrait être clair et indique le temps d'élution

V. Nettoyer la colonne après la complétion du gradient de séparation en la rinçant au tampon B pendant 5 à 10 minutes.

3. Collecte des fractions

I. Identifier le temps d'élution (2.IV.ii)
II. Collecter les fractions contenant l'oligonucléotide purifié au bon temps d'élution
III. Réunir les fractions collectées dans un seul récipient

4. Concentration de l'échantillon
   I. Concentrer les fractions collectées par évaporation douce sous vide ou dans un évaporateur rotatif jusqu'à obtenir un volume d'environ 50µL
   II. Ajouter 1mL de solution de déprotection (20% acide acétique)
   III. Laisser reposer 1h à température ambiante
   IV. Évaporer doucement jusqu'à sécheresse
5. Validation et stockage
   I. Dissoudre l'oligonucléotide dans 1mL d'eau RNase-free
   II. Répéter le séchage et la re-dissolution dans l'eau (PURIFICATION, 4(I-IV))
   III. Vérifier la pureté par spectroscopie UV

CRISPR – DESSALAGE FINAL

1. Préparation de l'HPLC
   I. Installer la colonne choisir sur le système HPLC
   II. Préparer et filtrer les tampons C et D (0,22µm)
   III. Ajouter les tampons C et D
2. Analyse préliminaire (sensiblement le même processus que PURIFICATION, 2(I-V)
   I. Injecter très peu de l'échantillon purifié pour déterminer son temps d'élution
   II. Exécuter un gradient de 0-100% tampon D sur 30 minutes
   III. Détecter les pics à une longueur d'onde de 260nm
3. Purification
   I. Injecter l'échantillon complet et exécuter le même gradient sur le tampon D
   II. Collecter les fractions correspondant au temps d'élution de l'oligonucléotide
4. Concentration et lavage
   I. Regrouper les fractions collectées contenant l'échantillon cible
   II. Concentrer les fractions collectées par évaporation douce ou lyophilisation
   III. Dissoudre l'échantillon concentré dans 500mL d'eau RNase-free
   IV. Répéter l'évaporation et la redissolution (II-III) 2x de plus

5. Stockage
   I. Dissoudre le produit final dans peu d'eau RNase-free et stocker à -20°C

Cas9 (23)

1. Conception et construction du plasmide d'expression
   I. Ajouter une étiquette protéique (tag) CL7 à l'extrémité N-terminale de la rpotéine Cas9
   II. Insérer un site de reconnaissance (ce qui permet à la protéine de se lier) pour la protéase HRV 3C entre l'étiquette CL7 et la protéine Cas9
   III. Utiliser un vecteur d'expression à choc froid (ex : pCold I) modifié avec un promoteur ***tac*** pour le contrôle de l'expression Cas9
   IV. Préparer le plasmide et le transformer dans des cellules *E. Coli Rosetta* (DE3)
2. Culture et expression de la protéine Cas9
   I. Cultiver les cellules transformées en milieu LB à 37°C jusqu'à une DO600 (Densité Optique à 600nm) de 0,8
   II. Induire l'expression avec 0,5 mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)
   III. Réduire la température à 16°C et laisser incuber toute la nuit pour permettre l'expression optimale de Cas9
3. Lyse cellulaire
   I. Récolter les cellules par centrifugation (5000G, 10 minutes, 4°C)
   II. Resuspendre les cellules dans un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl (pH de 7,4), 100 mM NaCl)
   III. Lyser les cellules par sonication ou presse française
4. Purification de la protéine Cas9
   I. Charger le lysat sur une colonne d'affinité Im7 (préalablement préparée avec des billes d'agarose liées à la protéine Im7)
   II. Laver la colonne avec le Tampon de lavage I (20mM Tris-HCL (pH 7,4), 300 mM NaCl) - deux cycles
   III. Ajouter la protéase HRV 3C marquée avec CL7 dans la colonne pour cliver l'étiquette. Laisser dans un milieu à 16°C pendant 3 heures

IV. Éluer la protéine Cas9 purifiée avec le Tampon de lavage II (20mM Tris-HCl (pH 7,4), 500 mM NaCl)
V. Concentrer la protéine Cas9 élue et la stocker à -80°C *(on rappelle que le chaud dénature, et le froid ralenti)* dans un tampon de stockage (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 500mM NaCl, 20% glycérine)

5. Assemblage de Cas9 avec l'ARN guide : Formation du complexe ribonucléoprotéique
   I. Mélanger la protéine Cas9 purifiée avec l'ARN guide produit préalablement dans un rapport molaire 1:1 ou légèrement excédentaire (<1,5) pour l'ARN guide
   II. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes dans un tampon sans RNase
      i. 20mM HEPES (pH 7,5); 150 mM KCl; 1 mM DTT; 5% glycérine; 1 mM MgCl2

ASSEMBLAGE FINAL – ÉLECTROPORATION/ÉLECTROPERMÉABILISATION

1. Préparation du complexe RNP
   I. Ajouter le complexe RNP à la suspension cellulaire dans le tampon MaxCyte
   II. Mélanger doucement en évitant les bulles
2. Chargement de la cassette d'électroporation
   I. Charger la suspension cellules + RNP (100 µL pour les cassettes OC-100)
   II. S'assurer de l'absence de bulles dans la cassette avant de la sceller
3. Électroporation avec MaxCyte Gen2 GT
   I. Insérer la cassette dans l'appareil
   II. Sélectionner le programme spécifique aux cellules CD34+ (aucun détail n'a été fourni dans la littérature)
   III. Lancer le processus d'électroporation
4. Post-électroporation
   I. Retirer la cassette et transférer les cellules électroporées dans un tube contenant du milieu de culture préchauffé à 37 °C
   II. Incuber les cellules à 37 °C, 5 % de CO_2, pendant au moins 30 minutes pour permettre la récupération
   III. Placer les cellules dans un milieu adapté à la culture des CD34+

RÉSULTATS

1. Évaluation de la fonctionnalité, efficacité et stabilité à long terme de l'édition génétique des cellules CD34+ humaines. Expérience in vivo sur des souris immunodéficientes NSG

Des cellules CD34+ humaines, modifiées génétiquement par la méthode CRISPR-Cas9 ont été injectées dans des souris NSG âgées de 6 à 8 semaines, après une irradiation totale du corps. Après 16 semaines, l'analyse du chimérisme humain (cytométrie) et un séquençage de l'ARN génomique montrent que les cellules humaines greffées ont persisté dans un environnement in vivo. Les cellules sont donc viables à long terme. (4)

2. Spécificité de l'édition

L'analyse des sites hors-cibles, réalisée par séquençage de capture hybrique, n'ont détecté aucune modification significative dans les régions identifiées par GUIDE-seq. (4)

3. Différentiation ex vivo

Les cellules modifiées ont été différenciées en érythroblastes ex vivo. Ces cellules expriment des niveaux augmentés d'hémoglobine fœtale (HbF), en cohérence avec les objectifs thérapeutiques de la correction génomique pour le traitement de la drépanocytose (9)

Voir **TABLE 2** et **TABLE 3** pour des résultats additionnels, fournis par des études préalables.

CONCLUSION

Cette étude met en évidence l'efficacité et la spécificité de la technique CRISPR-Cas9 et de son protocole dans l'édition génétique des cellules souches hématopoïétiques pour le traitement de la drépanocytose. La technologie CRISPR-Cas9 appliquée au CTX001 a permis d'inhiber avec succès l'expression de BCL11A, entraînant une augmentation des niveaux d'hémoglobine fœtale. Les résultats montrent une viabilité cellulaire post-modification élevée, une persistance in vivo prolongée des cellules et une différenciation ex vivo en érythroblastes fonctionnels. Ces résultats soutiennent la faisabilité clinique de cette approche et renforcent son potentiel pour surmonter les limitations actuelles des traitements conventionnels. En somme, le CTX001 représente une avancée significative pour les patients atteints de drépanocytose, offrant une alternative moins invasive et potentiellement plus accessible.

ANNEXE – FIGURES ET TABLES

FIGURE 1 – CORRÉLATION ENTRE HbS ET MALARIA (11)

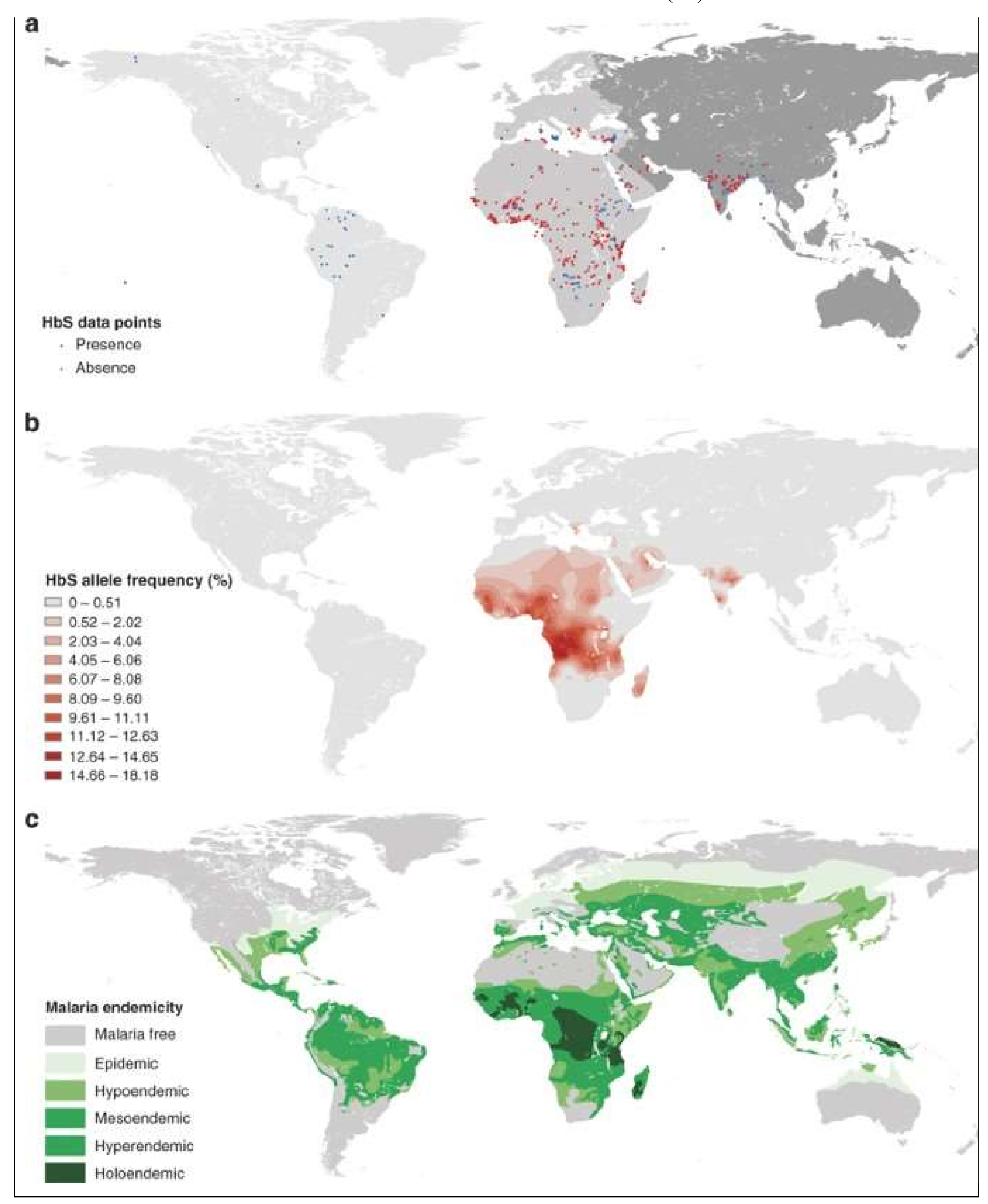


FIGURE 2 – PROTOCOLE CLIVAGE MANUEL (21)

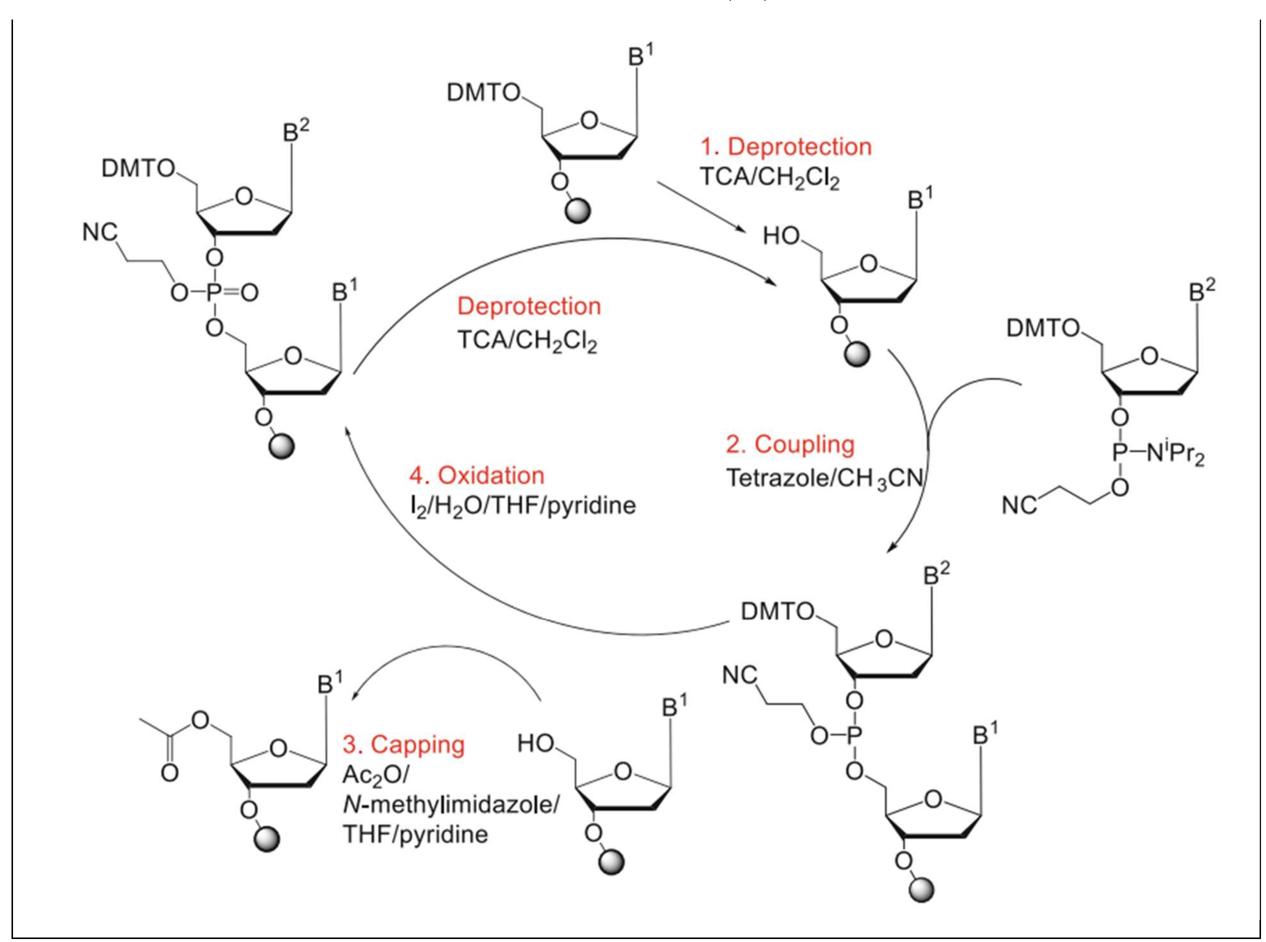


TABLE 1 – GÉNOTYPE DU PATIENT V. CONSÉQUENCES (3)

Génotype du patient	Constats, conséquences et manifestations cliniques
rs334(A;A)	Allèle normal
rs334(A;T)	Porteur hétérozygote de la drépanocytose (HbAS); Non-affecté d'anémie falciforme; Résistance plus élevée à la malaria
rs334(AG;AG)	Mutation commune (ClinVar); Aucunes manifestations
rs334(T;T)	Porteur homozygote de la drépanocytose; Affecté d'anémie falciforme

TABLE 2 - Proportion de l'hémoglobine totale composée de HbF (%) et taux d'hémoglobine total (g/dL) dans les patients atteints de drépanocytose, après infusion de CTX001 (24)

Temps écoulé	Proportion : moy (n, min, max))	Taux d'HB : moy (n, min, max)
3 mois	36.2% (43, 17.8%, 59.6%)	11.9 g/dL (43, 8.2 g/dL, 15.4 g/dL)
6 mois	44.3% (38, 14.9%, 68.4%)	12.3 g/dL (38, 7.2 g/dL, 15.9 g/dL)
12 mois	42.9% (32, 35.1%, 52.1%)	12.9 g/dL (31, 10.3 g/dL, 15.7 g/dL)
18 mois	43.1% (27, 27.5%, 53.3%)	12.7 g/dL (27, 11.0 g/dL, 17.3 g/dL)
24 mois	42.2% (17, 33.3%, 49.1%)	13.0 g/dL (17, 10.5 g/dL, 17.3 g/dL)

TABLE 3 – Proportion d'allèles avec les modifications génétiques attendues au fil du temps dans les patients atteints de drépanocytose, après infusion de CTX001 (24)

Temps écoulé	Proportion des allèles modifiées dans les cellules souches CD34+ moy (n, écart-type)	Proportion des allèles modifiées dans les cellules sanguines périphériques moy (n, écart-type)
1 mois		53.5% (42, 18.2%)
3 mois		70.8% (42, 10.6%)
6 mois	86.1% (37, 7.5%)	73.4% (38, 8.1%)
12 mois	86.1% (31, 8.6%)	74.2% (31, 8.7%)
24 mois	88.5% (16, 4.6%)	79.2% (17, 5.6%)

BIBLIOGRAPHIE

Des outils comme ChatGPT (OpenAI) ou Gemini (Alphabet) peuvent avoir été utilisés pour aider la synthèse, la compréhension et l'explication d'information. Aucun texte présent dans cet article n'a été rédigé par une IA (excluant les outils d'aide à l'écriture et à la correction, incluant toute IA génératrice), et toutes les informations ont été vérifiées au meilleur de nos capacités.

1. Comprendre les gènes : Qu'est-ce qu'un gène ? [Internet]. [cité 18 nov 2024]. Disponible sur: https://www.chusj.org/fr/soins-services/G/Genetique-medicale/comprendre-genes?faq=3157

2. Autosomal Recessive Disorder [Internet]. [cité 18 nov 2024]. Disponible sur: https://www.genome.gov/genetics-glossary/Autosomal-Recessive-Disorder

3. COLLECTIF. rs334 - SNPedia. In: SNPedia [Internet]. 2019 [cité 18 nov 2024]. Disponible sur: https://www.snpedia.com/index.php/Rs334

4. Inusa BPD, Hsu LL, Kohli N, Patel A, Ominu-Evbota K, Anie KA, et al. Sickle Cell Disease—Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. International Journal of Neonatal Screening. 7 mai 2019;5(2):20.

5. Cavazzana M. Thérapie génique pour la drépanocytose : avancées et obstacles. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. 1 janv 2024;208(1):70-8.

6. CHUM. L'anémie falciforme - Connaitre et comprendre la maladie. Centre de littératie en santé du CHUM [Internet]. avr 2020; Disponible sur: https://www.chumontreal.qc.ca/sites/default/files/2020-04/417-2-lanemie-falciforme-connaitre-et-comprendre-la-maladie.pdf

7. Alsultan H. Alternative therapy for sickle cell disease. Graduate Research Papers [Internet]. 1 janv 2015; Disponible sur: https://scholarworks.uni.edu/grp/67

8. Eaton WA, Bunn HF. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. Blood. 18 mai 2017;129(20):2719-26.

9. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β-Thalassemia. New England Journal of Medicine. 20 janv 2021;384(3):252-60.

10. Modell B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ. 1 juin 2008;2008(6):480-7.

11. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. Nat Commun. 2 nov 2010;1(1):104.

12. Sickle Cell Disease [Internet]. [cité 10 déc 2024]. Disponible sur: https://www.hematology.org/education/patients/anemia/sickle-cell-disease

13. Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, Ruehle CJ. Sickle-Cell Trait as a Risk Factor for Sudden Death in Physical Training. N Engl J Med. 24 sept 1987;317(13):781-7.

14. Fortier JF. Hématopoïétique (cellules souches). In: Encyclopédie aquariophilique. Aquaportail. France; 2024.

15. Eapen M, Brazauskas R, Walters MC, Bernaudin F, Bo-Subait K, Fitzhugh CD, et al. Effect of donor type and conditioning regimen intensity on allogeneic transplantation outcomes in patients with sickle cell disease: a retrospective multicentre, cohort study. Lancet Haematol. nov 2019;6(11):e585-96.

16. Charache S, Dover G, Smith K, Talbot CC, Moyer M, Boyer S. Treatment of sickle cell anemia with 5-azacytidine results in increased fetal hemoglobin production and is associated with nonrandom hypomethylation of DNA around the gamma-delta-beta-globin gene complex. Proc Natl Acad Sci USA. août 1983;80(15):4842-6.

17. Trompeter S, Roberts I. Haemoglobin F modulation in childhood sickle cell disease. Br J Haematol. févr 2009;144(3):308-16.

18. Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. Blood. 19 nov 2020;136(21):2392-400.

19. Frangoul H, Locatelli F, Sharma A, Bhatia M, Mapara M, Molinari L, et al. Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease. New England Journal of Medicine. 8 mai 2024;390(18):1649-62.

20. Esrick EB, Lehmann LE, Biffi A, Achebe M, Brendel C, Ciuculescu MF, et al. Post-Transcriptional Genetic Silencing of *BCL11A* to Treat Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 21 janv 2021;384(3):205-15.

21. Brazier J. Chemical Synthesis of Oligonucleotide Sequences : Phosphoramidite Chemistry. In: DNA Manipulation and Analysis [Internet]. Springer Science+Business Media, LLC. New York: Springer Nature; 2023 [cité 6 déc 2024]. p. 185-93. (Methods in Molecular Biology; vol. 2633). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3004-4

22. Ellington A, Pollard JDJ. Introduction to the synthesis and purification of oligonucleotides. Current Protocols in Nucleic Acid ChemistryChem. mai 2001;Appendix 3:Appendix 3C.

23. Qiao J, Li W, Lin S, Sun W, Ma L, Liu Y. Co-expression of Cas9 and single-guided RNAs in Escherichia coli streamlines production of Cas9 ribonucleoproteins. Commun Biol. 3 mai 2019;2(1):161.

24. CASGEVY. USPI examgamglogene autotemcel - HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION [Internet]. 2023. Disponible sur: https://pi.vrtx.com/files/uspi_exagamglogene_autotemcel.pdf